

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie,
Physikalische Medizin und Rehabilitation
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson

**Analyse von Periimplantatgeweben und des Einflusses
periprothetischer Fibroblasten auf die Osteoklastogenese bei
der aseptischen Endoprothesenlockerung**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Miriam Inge Köhler
aus Nürnberg

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstattein:	Prof. Dr. med. Susanne Mayer
Mitberichterstattein:	Priv.-Doz. Dr. Atilla Aszódi Priv.-Doz. Dr. Florian Haasters Priv.-Doz. Dr. Viktoria Bogner-Flatz
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	24.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Problemstellung	1
1.1.1 Der Stellenwert der Hüft- und Kniegelenksendoprothetik	1
1.1.2 Ausfallraten und Revisionsoperationen.....	1
1.1.3 Die Rolle der aseptischen Endoprothesenlockerung	4
1.1.4 Forschungsbedarf	4
1.2 Stand der Forschung	5
1.2.1 Grundlagen der aseptischen Endoprothesenlockerung	5
1.2.2 Die Rolle periprothetischer Fibroblasten bei der aseptischen Endoprothesenlockerung.....	7
1.2.3 Isolierte Untersuchung des Einflusses der Fibroblasten auf die Osteoklastogenese im Kokultur-Modell	9
1.3 Zielsetzung und Arbeitsanteil der Doktorandin	12
1.3.1 Ziel 1: Aufbau einer Sammlung orthopädischer Periimplantatgewebe und entsprechender Kulturen periprothetischer Fibroblasten.....	12
1.3.2 Ziel 2: Histologische und molekularbiologische Charakterisierung der periprothetischen Gewebe.....	13
1.3.3 Ziel 3: Gesonderte Untersuchung des Einflusses periprothetischer Fibroblasten auf die Osteoklastogenese	13
1.3.4 Fortführung der Experimente im Rahmen des DFG-Projekts: Untersuchung der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf dentale Implantatlockerungen ..	14
2 Zusammenfassung	15
2.1 Hintergrund	15
2.2 Zielsetzung.....	16
2.3 Methoden	16
2.4 Ergebnisse	17

2.5 Diskussion und Schlussfolgerung	17
3 Summary.....	19
3.1 Background.....	19
3.2 Objective	19
3.3 Methods	20
3.4 Results	20
3.5 Discussion and conclusion.....	21
4 Veröffentlichungen	23
4.1 Veröffentlichung I: Factors Regulating Bone Remodeling Processes in Aseptic Implant Loosening.....	23
4.2 Veröffentlichung II: Impact of Periprosthetic Fibroblast-Like Cells on Osteoclastogenesis in Co-Culture with Peripheral Blood Mononuclear Cells Varies Depending on Culture System.....	24
5 Literaturverzeichnis.....	25
6 Abkürzungsverzeichnis.....	31
7 Danksagung	32
8 Eidesstattliche Versicherung.....	34

Publikationsliste

Veröffentlichung I

Hartmann ES, Köhler MI, Huber F, Redeker JI, Schmitt B, Schmitt-Sody M, Summer B, Fottner A, Jansson V, Mayer-Wagner S. *Factors Regulating Bone Remodeling Processes in Aseptic Implant Loosening*. J Orthop Res. 2017 Feb;35(2):248-257.

Veröffentlichung II

Koehler MI, Hartmann ES, Schluessel S, Beck F, Redeker JI, Schmitt B, Unger M, van Griensven M, Summer B, Fottner A, Mayer-Wagner S. *Impact of Periprosthetic Fibroblast-Like Cells on Osteoclastogenesis in Co-Culture with Peripheral Blood Mononuclear Cells Varies Depending on Culture System*. Int J Mol Sci. 2019 May 26;20(10):2583.

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

1.1.1 Der Stellenwert der Hüft- und Kniegelenksendoprothetik

Implantationen von Hüft- oder Kniegelenksendoprothesen (HEP, KEP) gehören, insbesondere auch in Deutschland, zu den häufigsten Operationen. 2018 wurden in Deutschland etwa 435.000 endoprothetische Hüft- und Kniegelenkseingriffe durchgeführt [1, 2]. In einer Aufstellung der „häufigsten Operationen der vollstationären Patientinnen und Patienten“ der Gesundheitsberichterstattung des Bundes [3] befanden sich im Jahr 2018 der operative Hüftgelenkersatz an Rang 6 (1,4 % aller Operationen) und der operative Kniegelenkersatz an Rang 14 (1,1 % aller Operationen).

1.1.2 Ausfallraten und Revisionsoperationen

Ein wesentlicher limitierender Faktor der Hüft- und Kniegelenksendoprothetik ist jedoch die begrenzte Standzeit der Implantate. So entfällt ein nicht zu vernachlässigender Anteil von etwa 8 % der gesamten endoprothetischen Eingriffe auf Revisionsoperationen, z.B. in Folge von Lockerungen, Infektionen, Luxationen oder periprothetischen Frakturen [1, 2].

Sieht man sich die Langzeit-Ausfallraten der Prothesen unabhängig vom Patientenalter an, erhält man auf den ersten Blick insgesamt scheinbar vertretbare Werte. Gerade für die bei Implantation jüngeren Patienten besteht jedoch ein deutlich erhöhtes Risiko, eine Revisionsoperation zu benötigen. Eine 2017 erschienene Metaanalyse von Bayliss et al. kommt nach der Auswertung der Daten von 117.434 Patienten, die sich zwischen 1991 und 2011 im Alter von 50 – 89 Jahren (mittleres Alter HEP: 69,4 Jahre, KEP: 70,1 Jahre) einem Hüft- oder Kniegelenkersatz unterzogen, zu Überlebensraten der Hüftendoprothesen von 95,6 % nach 10 Jahren bzw. 85 % nach 20 Jahren und der Knieendoprothesen von 96,1 % nach 10 Jahren bzw. 89,7 % nach 20 Jahren [4]. Eine 2019 von Evans et al. publizierte Metaanalyse, die nur Fallstudien mit sehr langen Nachverfolgungszeiträumen von über 15 Jahren nach Hüftgelenkersatz einschloss (insgesamt 13.212 Implantationen), nennt Überlebensraten der Implantate von 85,74 % nach 15 Jahren, 78,81 % nach 20 Jahren und 77,62 % nach 25 Jahren [5]. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass gerade bei den älteren in die Metaanalyse eingeschlossenen Patienten falsch niedrige Ausfallraten der Endoprothesen erfasst sind. Je älter die Patienten bei der Implantation sind, desto höher ist die

Wahrscheinlichkeit, dass später eine spezifische Diagnostik oder gar Revision – z.B. aufgrund schwerer Nebenerkrankungen, Immobilität oder Versterben der Patienten – gar nicht mehr erfolgen und entsprechend nicht dokumentiert sind.

Wenn Patienten zum Zeitpunkt der Erstimplantation hingegen jünger sind, konnte gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit, dass ein Prothesenwechsel notwendig wird, deutlich erhöht ist. Das National Joint Registry (NJR), in dem alle Endoprothesenprozeduren in Großbritannien, Wales, Nordirland und Isle of Man verpflichtend erfasst werden, zeigt im Report 2019 die negative Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der Ausfallwahrscheinlichkeit der Hüft- und Kniegelenksprothesen eindrucksvoll auf [6]. Anhand der zwischen 2003 und 2018 übermittelten Daten zeigt sich hier für die Gruppe der bei Hüftendoprothesen-Erstimplantation 65- bis 74-Jährigen ein kumulatives Ausfallrisiko nach 15 Jahren von 7,28 % bzw. 5,98 % (männliche bzw. weibliche Patienten). Im Vergleich hierzu sind es bei dem jüngeren Kollektiv der zum Zeitpunkt der Implantation unter 55-Jährigen nach 15 Jahren bereits 11,1 % bzw. 13,85 % (s. Abbildung 1). Noch deutlicher verhält es sich bei den Knieendoprothesen (s. Abbildung 2) [6]. Ein ähnliches Bild ergab sich auch in der bereits genannten Metaanalyse von Bayliss et al. in einer Subgruppenanalyse. Hier wurde für, zum Zeitpunkt des Hüft- bzw. Kniegelenksersatzes noch relativ junge, nämlich 50 – 54 Jahre alte, männliche Patienten ein mittleres Lebenszeitrisko von 29,6 % (HEP) bzw. 35,0 % (KEP) für eine Revisionsoperation errechnet, die somit etwa ein Drittel dieser Patientengruppe betreffen würde [4].

Revisionsoperationen nach endoprothetischem Knie- oder Hüftgelenksersatz bringen hohe Kosten mit sich, die die der Primärimplantation deutlich übersteigen [7, 8]. Hinzu kommt, dass die erneuten Eingriffe mit einem erhöhten Risiko für die Patienten einhergehen. In einer monozentrischen Studie aus dem Jahr 2005 zeigten sich beispielsweise 41 % längere Operationszeiten (4,5 vs. 3,2 Stunden, $p < 0,0001$), 160 % mehr Blutverlust (1348 ml vs. 518 ml, $p < 0,0001$), und eine tendenziell höhere Komplikationsrate (29 % vs. 22 %, nicht signifikant) bei Revisionsoperationen von Hüftendoprothesen im Vergleich zu Eingriffen im Rahmen der Erstimplantation [8]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass nach Endoprothesenrevisionen ein schlechteres funktionelles Ergebnis zu erwarten ist, als nach Erstimplantationen [9, 10].

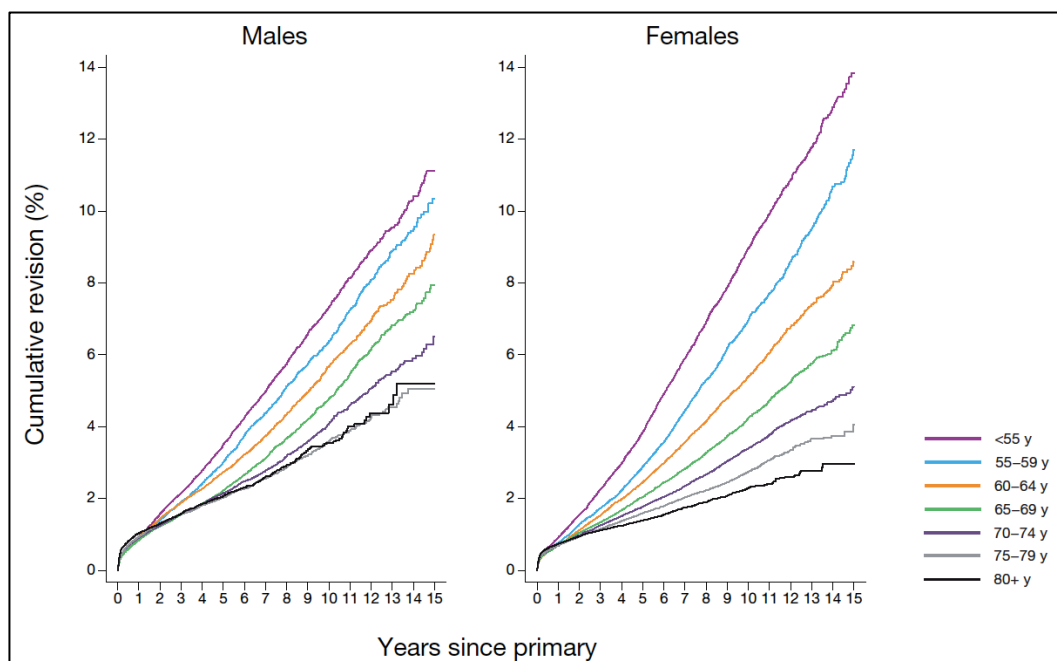


Abbildung 1: Bei Patienten, die zum Zeitpunkt der Erstimplantation einer Hüftendoprothese jünger sind, besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit einer späteren Revisionsoperation. Aus: NJR 16th Annual Report 2019 [6], Daten von 01.04.2003 bis 31.12.2018. Die Altersangaben beziehen sich auf das Alter zum Zeitpunkt der Erstimplantation.

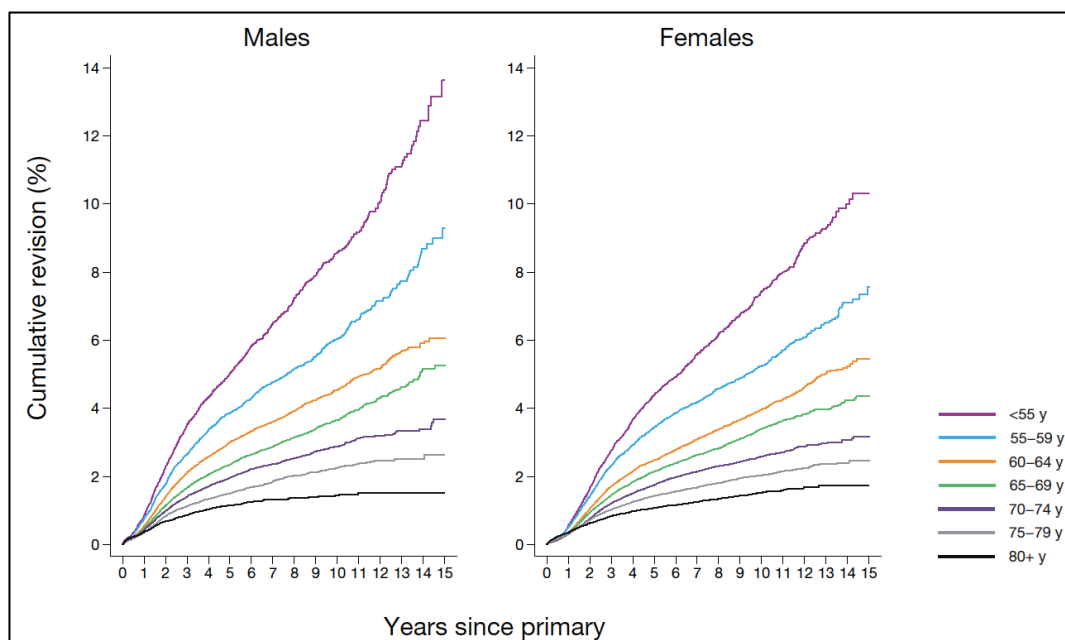


Abbildung 2: Bei Patienten, die zum Zeitpunkt der Erstimplantation einer Knie totalendoprothese jünger sind, besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit einer späteren Revisionsoperation. Aus: NJR 16th Annual Report 2019 [6], Daten von 01.04.2003 bis 31.12.2018. Die Altersangaben beziehen sich auf das Alter zum Zeitpunkt der Erstimplantation.

1.1.3 Die Rolle der aseptischen Endoprothesenlockerung

Die häufigste Indikation für eine Revisionsoperation von Hüft- und Knieendoprothesen ist die aseptische Lockerung. Andere Ursachen, wie Infektionen, periprothetische Frakturen oder Luxationen sind deutlich seltener. In Deutschland können die Daten endoprothetischer Eingriffe auf freiwilliger Basis zur Auswertung an das Endoprothesenregister Deutschland (EPRD) weitergeleitet werden. 2018 wurden im Register etwa 67 % aller entsprechenden Operationen erfasst. Aseptische Lockerungen stellten sowohl bei Hüft- als auch bei Kniegelenksprothesen mit 29,8 % bzw. 25,0 % den häufigsten Grund für eine Revision dar [11]. Das NJR nennt mit 40,5 % bei Hüft- und 35 % bei Kniegelenksprothesenrevisionen sogar noch deutlich höhere Werte (Auswertung der Jahre 2014 – 2018) [6].

1.1.4 Forschungsbedarf

Um in Zukunft daher gerade auch einem zunehmend jüngeren und aktiveren, bzw. immer langlebigeren Patientenkollektiv einen endoprothetischen Hüft- oder Kniegelenksersatz mit einem guten Nutzen-Risiko-Profil anbieten zu können, ist es essenziell, möglichst hohe Standzeiten der Implantate zu gewährleisten und entsprechend die Notwendigkeit von Revisionen oder gar Re-Revisionen zu minimieren.

Aufgrund der anteilig hohen Fallzahlen muss die Vermeidung insbesondere der aseptischen Endoprothesenlockerung sicherlich ein wesentliches Ziel weiterer Entwicklungen sein. Neben der Erforschung möglichst günstiger Materialpaarungen, ist vor allem auch ein tiefgreifendes Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge im periprothetischen Gewebe notwendig, um mögliche therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren.

1.2 Stand der Forschung

1.2.1 Grundlagen der aseptischen Endoprothesenlockerung

1.2.1.1 Überblick

Zwischen Knochen und Endoprothese bildet sich ein gut vaskularisiertes, fibröses, sogenanntes periprotetisches Gewebe aus. Hier kommt es bei der aseptischen Lockerung, ausgelöst durch phagozytierte Abriebpartikel des Endoprothesenmaterials und durch die veränderten biomechanischen Einflüsse, zur Ausschüttung verschiedener Entzündungsfaktoren. Dadurch werden Signalkaskaden in Gang gesetzt, die letztendlich über eine Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten zur Entstehung periprotetischer Osteolysen und zur ossären Desintegration des Implantats führen [12-14]. Bei aseptisch gelockerten Endoprothesen finden sich im periprotetischen Gewebe neben einer hohen Anzahl von Fibroblasten insbesondere auch Makrophagen. Osteoklasten können vor allem in den dem Knochen anliegenden Gewebeanteilen nachgewiesen werden. In Abgrenzung zu septisch gelockerten Endoprothesen zeigen sich bei der aseptischen Lockerung nur sehr wenige Neutrophile im periprotetischen Gewebe [14].

1.2.1.2 Osteoklasten und Osteoklastogenese

Osteoklasten sind multinukleäre Zellen, die im Rahmen der Osteoklastogenese durch die Fusion monozytärer Vorläuferzellen entstehen [15, 16]. Aktive Osteoklasten geben auf der dem Knochen zugewandten Seite lysosomale Enzyme und Protonen ab, die letztendlich zur Resorption von Knochenmatrix führen [16]. Reife Osteoklasten können somit neben ihren morphologischen Eigenschaften unter anderem auch an der Expression der lytischen Enzyme TRAP (tartrate resistant acid phosphatase) und Cathepsin K erkannt werden. Das spezifischste Merkmal zur Identifizierung reifer Osteoklasten ist jedoch ihre Fähigkeit Knochen zu resorbieren [15, 17].

Als wesentliche, direkte Mediatoren der Osteoklastogenese gelten M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) [15, 18], RANK-L (receptor activator of NF- κ B ligand) [15, 19] und OPG (osteoprotegerin) [15, 20]. 1998 konnten Quinn et al. zeigen, dass sich Monozyten des peripheren Bluts (PBMCs, peripheral blood mononuclear cells) *in vitro* durch eine Stimulation mit M-CSF und RANK-L zu Knochen resorbierenden Osteoklasten differenzieren lassen [21].

M-CSF unterstützt hierbei vor allem die Proliferation der Osteoklasten-Vorläuferzellen und die initialen Differenzierungsschritte [15, 22]. M-CSF verbessert aber auch das

Überleben reifer Osteoklasten [22, 23] und kann verstärkend auf deren osteolytische Aktivität wirken [24].

Neben M-CSF spielt die Interaktion von RANK (receptor activator of NF- κ B), RANK-L und OPG eine wichtige Rolle bei der Osteoklastogenese. RANK-L, ein Protein aus der Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) [19], bindet an den membrangebundenen Rezeptor RANK der Osteoklasten und deren Vorläuferzellen [25]. Effekte dieser Bindung sind eine Förderung der Differenzierung [15, 19], eine Verhinderung der Apoptose [15, 22, 23], sowie die Aktivierung reifer Osteoklasten [15, 19]. OPG agiert als Gegenspieler von RANK-L. Es kann die Protein-Rezeptor-Bindung zwischen RANK-L und RANK verhindern, indem es seinerseits als sogenannter Decoy-Rezeptor RANK-L bindet [15, 19]. Als ein wichtiger Indikator, ob ein eher osteoprotektives oder ein osteolysebegünstigendes Milieu vorliegt, gilt das Verhältnis der RANK-L- zur OPG-Expression, also die RANK-L/OPG-Ratio [26, 27].

Über die genannten, direkten Mediatoren hinaus, stimulieren viele Entzündungsfaktoren, wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) oder TNF α , die Osteoklastogenese indirekt [15, 28]. Sie haben zusätzlich einen fördernden Einfluss auf die Knochenresorption reifer Osteoklasten [15, 29] und sorgen durch eine Hemmung der Apoptose für ein verlängertes Überleben der Osteoklasten [22, 23].

Es wird diskutiert, ob TNF α ebenfalls eine Rolle als direkter Mediator der Osteoklastogenese spielt und über einen zusätzlichen Signalweg eine RANK-L unabhängige Osteoklastogenese induziert. Die alleinige Zugabe von M-CSF und TNF α (bzw. zusätzlich IL-1 α [30] oder IL-6 [31, 32]) zu aus Knochenmarkskulturen isolierten Monozyten führte zur Ausbildung reifer, resorbierender Osteoklasten [30-35]. Ob es sich hierbei tatsächlich um einen von RANK-L unabhängigen Signalweg handelt, oder ob durch die Zugabe von TNF α lediglich eine initial niedrige, intrinsische RANK-L-Expression der in den Versuchen eingesetzten Zellkulturen erhöht wurde, wird kontrovers diskutiert. Während Lam et al. postulierten, dass RANK-L für eine durch M-CSF und TNF α induzierte Osteoklastogenese zumindest in geringen Mengen vorhanden sein müsse und diese mithilfe von OPG auch entsprechend hemmen konnten [35], war dies bei anderen Autoren nicht möglich [30, 32, 34]. In einer Arbeit von O'Brien et al. konnte sogar in Kulturen von Osteoklastenvorläufern RANK-defizienter Mäuse nach einer Stimulation mit M-CSF und TNF α eine vollständige Osteoklastogenese nachgewiesen werden [31].

1.2.1.3 Molekularbiologische Analysen

In periprotetischen Geweben aseptisch gelockerter Endoprothesen konnten die genannten direkten und indirekten Mediatoren der Osteoklastogenese nachgewiesen werden [14, 36-41]. Im Vergleich zu Synovialgewebe der Negativkontrollen wurden erhöhte Expressionsraten von M-CSF [36], sowie angehobene [37, 39] bzw. stabile [38, 40] Expressionsraten von RANK-L beobachtet. Die OPG-Expression zeigte sich erniedrigt [36, 38-40] oder unverändert [37]; hieraus resultierten entsprechend hohe RANK-L/OPG-Ratios [37-40]. $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und IL-6 wurden entweder als gleich [36, 38, 40] oder vermehrt [41] exprimiert beschrieben. Zusätzlich wurden auch erhöhte Expressionsniveaus der Osteoklastenmarker TRAP und Cathepsin K [36, 38], sowie verschiedener Matrixmetalloproteinasen (MMPs) [42] beobachtet. Freigesetzte MMPs können extrazelluläre Matrix abbauen und begünstigen dadurch vermutlich zusätzlich die Desintegration von Endoprothesen [43].

Eine metaanalytische Auswertung der genannten Studien ist jedoch dadurch limitiert, dass jeweils nur einzelne Faktoren untersucht wurden. Eine vollständige Analyse, zumindest aller direkten Mediatoren der Osteoklastogenese innerhalb einer Publikation, existierte bisher nicht. Die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Studien ist zusätzlich durch die Verwendung unterschiedlicher Kontrollgewebe (Synovialis aus arthrotisch veränderten Gelenken [36, 38-40], aus Hüftgelenken nach Schenkelhalsfraktur [37] bzw. makroskopisch unverändertes Gewebe aus Kniegelenken, gewonnen im Rahmen diagnostischer Arthroscopien [39]) eingeschränkt.

Hinsichtlich der Rolle von Osteoblasten im Rahmen der aseptischen Lockerung konnte in *in-vitro*-Studien durch die Zugabe von Abriebpartikeln zu Osteoblastenkulturen eine verminderte Expression von Kollagen 1 [44, 45] und ALP (Alkalische Phosphatase) [46] nachgewiesen werden.

1.2.2 Die Rolle periprotetischer Fibroblasten bei der aseptischen Endoprothesenlockerung

1.2.2.1 Therapieversuche mit Bisphosphonaten

Die Knochenresorption der Osteoklasten bildet, wie oben beschrieben, die Endstrecke der in die Entstehung periprotetischer Osteolysen involvierten Signalkaskaden. Dennoch erwies sich die naheliegende Anwendung von Bisphosphonaten – die bei Osteoporose-Patienten erfolgreich eingesetzt werden und zur Hemmung der Aktivität sowie zur Induktion einer Apoptose der Osteoklasten führen [47] – als keine zielführende Therapieoption.

In einem *in-vivo*-Tiermodell an Schädelkalotten von Mäusen schützten weder Alendronat noch Zoledronat ausreichend vor partikelassoziierten Osteolysen [48]. Auch Studien zur prophylaktischen Gabe von Bisphosphonaten bei Patienten nach Implantation einer Hüft- oder Kniegelenksendoprothese konnten keinen signifikanten Vorteil hinsichtlich des langfristigen Outcomes belegen [49-51].

Die mangelnde Wirksamkeit von Bisphosphonaten bei aseptischen Prothesenlockerungen ist am ehesten dadurch bedingt, dass hier inflammatorische Prozesse den Knochenstoffwechsel wesentlich mitregulieren. Dieses Phänomen ist bereits von anderen entzündlichen, mit Osteolysen einhergehenden Erkrankungen bekannt. So konnte für Bisphosphonate zum Beispiel auch hinsichtlich der Verhinderung knöcherner Erosionen bei der rheumatoiden Arthritis keine signifikante Wirksamkeit belegt werden [52-54]. Eine Ursache des Wirkverlusts unter inflammatorischen Bedingungen könnte unter anderem sein, dass in Anwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ die Fähigkeit der Bisphosphonate, eine Apoptose von Osteoklasten zu induzieren, signifikant reduziert ist [55].

1.2.2.2 Die aseptische Endoprothesenlockerung im Kontext anderer entzündlicher Erkrankungen

Es wird mittlerweile davon ausgegangen, dass die aseptische Endoprothesenlockerung im Kontext anderer entzündlicher Erkrankungen einzuordnen ist, bei denen es im Rahmen einer Aktivierung des Immunsystems zu einer vermehrten Knochenresorption kommt. Obwohl sich die initialen Auslöser der Inflammation unterscheiden, ähneln sich die molekularpathologischen Vorgänge, die letztendlich über die Entzündungsreaktion zur Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten führen, bei all diesen Erkrankungen [27, 56, 57]. Beispiele hierfür finden sich sowohl bei Autoimmunerkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis), als auch bei Fremdkörperreaktionen (z.B. aseptische Lockerung von Zahn- oder orthopädischen Implantaten) oder im Rahmen septisch vermittelter Prozesse, wie der Periodontitis [27, 28, 56, 57].

1.2.2.3 Die Rolle fibroblastärer Zellen bei der Osteoklastogenese im Rahmen entzündlicher Erkrankungen

Im Hinblick auf die genannten Erkrankungen rückt die Rolle knochen naher Fibroblasten zunehmend in den Fokus der Untersuchungen. Fibroblasten können, ähnlich wie Osteoblasten, sowohl osteoprotektive als auch die Osteoklastogenese bzw. die Knochenresorption fördernde Zytokine exprimieren. So wurde in Fibroblasten u.a. die Expression von RANK-L [58-61], M-CSF [60], $\text{TNF}\alpha$ [62], OPG [58-60], $\text{IL-1}\beta$ [59, 62]

und IL-6 [59] nachgewiesen. Es wird angenommen, dass Fibroblasten insbesondere bei entzündlichen Erkrankungen einen relevanten Einfluss auf den Knochenumbau ausüben [56, 57, 63]. Gravalles et al. konnten zeigen, dass synoviale Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis RANK-L exprimieren, während in synovialen Fibroblasten gesunder Probanden und in Haut-Fibroblasten keine Expression nachgewiesen wurde [61]. Bei Mäusen mit rheumatoider Arthritis wurde beobachtet, dass eine gezielte RANK-L-Deletion in Synovia-Fibroblasten zu einer signifikant reduzierten Osteoklastogenese und einer signifikant geringeren Knochenerosion führte [64]. Fibroblasten stellen somit möglicherweise einen relevanten therapeutischen Angriffspunkt der durch eine Inflammation induzierten übermäßigen Knochenresorption dar.

1.2.3 Isolierte Untersuchung des Einflusses der Fibroblasten auf die Osteoklastogenese im Kokultur-Modell

Um zu untersuchen, wie und unter welchen Bedingungen Fibroblasten eine Osteoklastogenese induzieren können, wurde bereits mehrfach ein Kokultur-Modell herangezogen [58, 60, 65-69]. Hierzu wurden Fibroblasten mit PBMCs zusammen kultiviert und die Kulturen schließlich auf das Vorhandensein reifer, resorbierender Osteoklasten hin untersucht. Ein potenzieller Vorteil solcher Kokulturen liegt darin, dass der Einfluss verschiedener Entzündungsfaktoren bzw. pharmakologischer Wirkstoffe auf die Rolle der Fibroblasten bei der Osteoklastogenese isoliert betrachtet werden kann.

1.2.3.1 Zusammenfassung bisheriger Studienergebnisse

Die bisher veröffentlichten Studien unterscheiden sich voneinander sowohl durch die Herkunft der verwendeten Fibroblasten als auch durch die jeweils zugegebenen Stimulationsfaktoren. Eine Differenzierung von PBMCs zu resorbierenden Osteoklasten konnte in Kokulturen beobachtet werden, die entweder mit M-CSF und RANK-L [65, 66], mit M-CSF [58, 67], mit Calcitriol und Dexamethason [60] oder mit Calcitriol und M-CSF [68] stimuliert wurden. In einer Arbeit konnte eine vollständige Osteoklastogenese in Kokulturen ohne die Zugabe zusätzlicher Faktoren erreicht werden [69]. Neben osteoklastogenese-fördernden Einflüssen der Fibroblasten wurden jedoch teilweise auch vorwiegend osteoprotektive Eigenschaften beschrieben [65, 66]. De Vries et al. wiesen zum Beispiel in unstimulierten Kokulturen von Gingiva- bzw. parodontalen Fibroblasten und PBMCs hohe Expressionsraten von OPG nach, die eine vollständige Osteoklastogenese verhinderten [65].

1.2.3.2 Limitationen des bisher verwendeten Kokultur-Modells

Die bisher angewandten Kokulturen bieten somit zwar ein einfach zugängliches Modell, um die Interaktion von Fibroblasten und PBMCs isoliert zu untersuchen; valide Daten lassen sich in Anbetracht der inhomogenen Ergebnisse bisheriger Studien jedoch nur in sehr limitiertem Umfang ableiten. Mit mal überwiegend osteoklastogenen, mal vor allem osteoprotektiven Eigenschaften der Fibroblasten in der Kokultur erscheint das Modell insbesondere nicht reproduzierbar genug, um den Einfluss von Fibroblasten auf die Osteoklastogenese strukturiert zu analysieren und gegebenenfalls experimentell zu verändern. Die in den Kokulturen nachgewiesenen hohen OPG-Expressionen mit entsprechend niedrigen RANK-L/OPG-Ratios [65, 66] widersprechen außerdem den eingangs genannten Ergebnissen der Untersuchungen kompletter periprothetischer Gewebe [37-40]. Dies legt eine Änderung des Expressionsprofils der in den Kokultur-Modellen eingesetzten Fibroblasten im Vergleich zu ihren *in-vivo*-Eigenschaften nahe.

1.2.3.3 Beeinflussung des Expressionsprofils von Fibroblasten durch Umweltfaktoren

Ursache hierfür sind am ehesten die sich vom *in-vivo*-Umfeld deutlich unterscheidenden Umweltgegebenheiten im Kokultur-Modell. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass Fibroblasten abhängig von den Kulturbedingungen die Genexpression, insbesondere auch von RANK-L und OPG, rasch ändern. Kanazki et al. beobachteten zum Beispiel, dass periodontale Fibroblasten, die 0,5 – 48 Stunden mechanisch komprimiert worden waren, eine erhöhte RANK-L-Expression aufwiesen. Die OPG-Expression blieb hingegen gleich [70]. Kook et al. beschrieben eine erhöhte RANK-L- und eine deutlich höhere OPG-Expression bei Fibroblasten, die über 90 Minuten zentrifugiert worden waren [71]. Beide Studien belegen, dass bereits eine relativ kurz andauernde Modifikation der Umweltbedingungen zu signifikanten Änderungen der Genexpression von Fibroblasten führen kann.

Eine solche Instabilität des Expressionsprofils der Fibroblasten schränkt natürlich einerseits grundsätzlich die Aussagekraft von *in-vitro*-Kokultur-Studien ein. Andererseits könnte jedoch die rasche Veränderbarkeit der Genexpression auch therapeutisch genutzt werden. So wäre es grundsätzlich denkbar, dass eine Änderung des Expressionsprofils der Fibroblasten zugunsten einer vermehrt osteoprotektiven Funktion, z.B. durch die medikamentöse Hemmung einer Entzündungsreaktion, gezielt hervorgerufen werden kann. Um dies jedoch experimentell zu untersuchen, wird ein reproduzierbares *in-vitro*-Modell benötigt.

1.2.3.4 Optimierte Kokultur im Transwell-System

Einen Ansatz für ein zwar weiterhin einfach durchzuführendes, aber trotzdem hinsichtlich der Umweltbedingungen optimiertes Kulturmodell bietet das sogenannte Transwell-System. *In vivo* haben Zellen in Geweben nach allen Seiten hin Kontakt zu anderen Zellen bzw. zur extrazellulären Matrix. In den oben beschriebenen, bisher angewandten Kokulturen auf herkömmlichen Kulturplatten beschränkt sich dieser Zellkontakt im Wesentlichen auf die jeweils seitlich umgebenden Zellen. Durch den Plattenboden besteht zudem eine große Kontaktfläche zu Fremdmaterial. In sogenannten Transwell-Systemen werden Zellen im Nährmedium hängend auf einer Membran kultiviert. Eine Versorgung der Kultur mit Medium wird daher nicht nur von oben, sondern auch vom Kulturboden her sichergestellt [73, 74]. Fibroblasten bilden auf den Membranen, bedingt durch eine höhere Proliferation und Zelldichte [74], pellet-ähnliche Strukturen, in denen sie nicht nur nebeneinander, sondern auch übereinander angeordnet sind (s. Abbildung 3). Dies bietet den Vorteil, dass die interzelluläre Kontaktfläche größer ist, während gleichzeitig weniger Kulturanteile mit Fremdmaterial in Verbindung stehen. Eine so optimierte Kultivierung könnte entsprechend ein den *in-vivo*-Eigenschaften näheres Expressionsprofil der Zellen zur Folge haben und so als Grundlage für weiterführende Untersuchungen dienen.

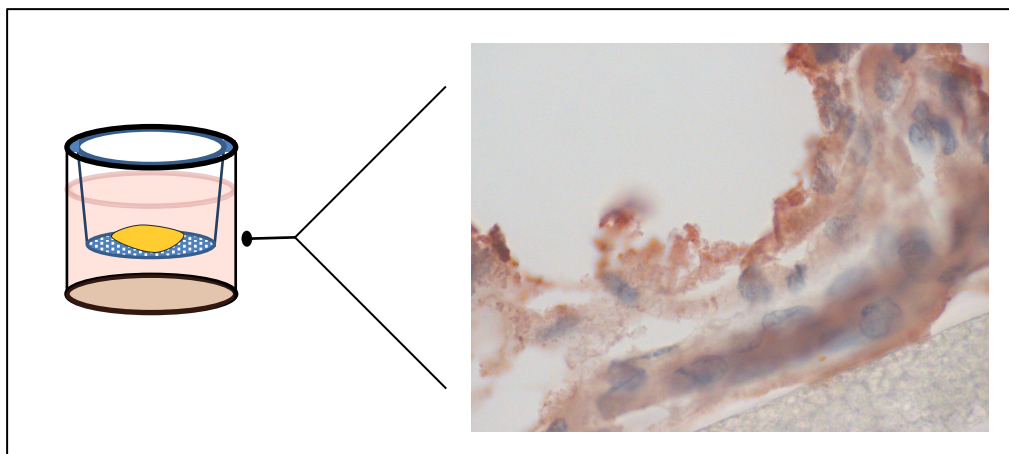


Abbildung 3: Links: Schemazeichnung eines wells (schwarz) mit Transwell-insert (blau). Die Zellen (gelb) werden auf einer im Medium hängenden Membran kultiviert. Rechts: Gefrierschnitt einer Transwell-Kultur periprothetischer Fibroblasten (100-fach vergrößert), gefärbt mit anti-S100 [72].

1.3 Zielsetzung und Arbeitsanteil der Doktorandin

Das Ziel der vorliegenden Arbeiten war einerseits eine umfassende Charakterisierung periprothetischer Gewebe aseptisch gelockerter Hüft- und Knieendoprothesen unter Einbeziehung zumindest aller direkten Mediatoren der Osteoklastogenese. In einem zweiten Teil lag der Fokus dann auf der isolierten Untersuchung der Funktion periprothetischer Fibroblasten bei der Osteoklastogenese in Kokulturen mit PBMCs. Insbesondere sollte hier der Einfluss eines neuen, mutmaßlich besser geeigneten Transwell-Systems auf die Eigenschaften der Kokulturen evaluiert werden.

Die vorliegende Doktorarbeit beinhaltet einen Teil der wissenschaftlichen Arbeit, die im Rahmen des DFG-Projekts „Analyse periprothetischer Fibroblasten und deren Funktion im Bereich orthopädischer und dentaler Implantatlockerungen“ (Deutsche Forschungsgemeinschaft, Prof. Dr. med. Susanne Mayer, Projektnummer 192241435) durchgeführt wurde. Die Projektanteile, die durch die Doktorandin bearbeitet wurden, sind im Folgenden zusammengefasst.

1.3.1 Ziel 1: Aufbau einer Sammlung orthopädischer Periimplantatgewebe und entsprechender Kulturen periprothetischer Fibroblasten

2011 wurde begonnen, periprothetisches Gewebe aseptisch gelockerter Knie- und Hüftendoprothesen, das im Rahmen von Revisionsoperationen gewonnen wurde, zu asservieren. Neben der Anfertigung histologischer Schnitte wurden fibroblastäre Zellen zur weiteren Kultivierung und RNA für Expressionsanalysen isoliert. Als Referenzgewebe wurde zusätzlich Synovialgewebe von Patienten, die sich aufgrund einer Arthrose einer Endoprothesenimplantation unterzogen hatten, gesammelt.

Die Doktorandin war zusammen mit einer zweiten Doktorandin des Labors, Eliza Hartmann, unter Anleitung von Frau Professor Mayer für die Planung des Projekt-Ablaufs, die Auswahl passender Patienten, die Etablierung bzw. Anpassung der Protokolle zur Asservierung und Aufbereitung der Gewebe und schließlich auch für die praktische Durchführung der Methodik zuständig.

1.3.2 Ziel 2: Histologische und molekularbiologische Charakterisierung der periprothetischen Gewebe

In Anbetracht der bisher nur auf jeweils wenige Gene fokussierten Expressionsanalysen periprothetischer Gewebe in der Literatur, wurde eine umfassende Auswertung zumindest aller direkten Mediatoren der Osteoklastogenese mit zusätzlicher Analyse einiger osteoblastärer und osteoklastärer Marker durchgeführt. Ergänzend erfolgte eine histologische Charakterisierung. In die Untersuchung wurden letztendlich Periimplantatgewebe von 24 Patienten und Referenzgewebe von 18 Patienten eingeschlossen. Die Ergebnisse wurden im Rahmen der Publikation „Factors Regulating Bone Remodeling Processes in Aseptic Implant Loosening“ [75] veröffentlicht, die Teil der vorliegenden Dissertation ist.

Neben den genannten Tätigkeiten im Rahmen der Gewebeasservierung war die Doktorandin zusammen mit Frau Hartmann und mit Unterstützung von Frau Julia Redeker (biologisch-technische Assistentin) für die Etablierung und Optimierung der notwendigen molekularbiologischen Methodik, insbesondere die Auswahl und Testung von Primern und zugehörigen PCR-Programmen, zuständig. Als Ko-Autorin war die Doktorandin außerdem an der Verfassung und Revision des eingereichten Manuskripts beteiligt.

1.3.3 Ziel 3: Gesonderte Untersuchung des Einflusses periprothetischer Fibroblasten auf die Osteoklastogenese

Im Rahmen dieses Projektteils sollten weitere Erkenntnisse über die Rolle periprothetischer Fibroblasten bei der Regulation der Osteoklastogenese erlangt werden. Hierzu wurde der Einfluss periprothetischer Fibroblasten auf PBMCs einerseits in Kokulturen auf herkömmlichen Adhäsionsplatten charakterisiert. Zusätzlich wurde ein hinsichtlich der Kulturbedingungen verbessertes Kokultur-Modell auf Transwell-Membranen etabliert und bezüglich seiner Auswirkungen auf die Kokulturen vergleichend untersucht.

Die Ergebnisse dieses Projekts wurden unter dem Titel „Impact of Periprosthetic Fibroblast-Like Cells on Osteoclastogenesis in Co-Culture with Peripheral Blood Mononuclear Cells Varies Depending on Culture System“ [72] veröffentlicht.

Die Doktorandin war unter Anleitung von Frau Professor Mayer hauptverantwortlich für die Planung und Umsetzung dieses Projektteils. Sie kümmerte sich um die Etablierung und ggf. Anpassung der notwendigen Methodik im Labor für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie der LMU München, teilweise mit externer Unterstützung

durch Herrn Professor Martijn van Griensven und Frau Marina Unger (Labor für experimentelle Unfallchirurgie, TU München), sowie durch Herrn Dr. Burkhard Summer (Labor der Klinik für Dermatologie und Allergologie, LMU München). Die Protokolle zur Methodik der im Rahmen des Projekts neu etablierten Transwell-Kokulturen wurden von der Doktorandin selbstständig erarbeitet. Sowohl die Planung der Versuche, als auch deren praktische Durchführung und Auswertung erfolgten durch die Doktorandin. Schließlich war sie als Erstautorin zuständig für die Verfassung und Einreichung des Manuskripts, sowie die Bearbeitung im Rahmen des Revisionsprozesses.

1.3.4 Fortführung der Experimente im Rahmen des DFG-Projekts: Untersuchung der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf dentale Implantatlockerungen

In einem weiteren Projektteil sollten die Ergebnisse der Charakterisierung der orthopädischen periprothetischen Gewebe mit den Eigenschaften von Periimplantatgeweben gelockerter dentaler Implantate verglichen werden. Hierzu wurde durch die Doktorandin begonnen, die oben genannten Methoden zur Asservierung und Aufbereitung von Geweben für die Untersuchung dentaler Periimplantatgewebe anzupassen und an ersten Proben zu testen (in Zusammenarbeit mit dem Labor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der LMU). Die weitere Bearbeitung dieses Projektteils wurde von Frau Sabine Schlüssel im Rahmen ihrer Promotion übernommen.

2 Zusammenfassung

[72, 75]

2.1 Hintergrund

Aseptische Lockerungen aufgrund periprotektischer Osteolysen sind eine schwerwiegende und häufige Spätkomplikation des endoprothetischen Hüft- und Kniegelenkersatzes [4-11]. Im Wesentlichen kommt es, ausgelöst durch periprotektische Entzündungsreaktionen, zur vermehrten Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten [12-14]. Im Vergleich zu Negativkontrollen, konnten in periprotektischen Geweben gelockerter Endoprothesen veränderte Expressionsniveaus von Osteoklastenmarkern und Mediatoren der Osteoklastogenese nachgewiesen werden [36-40]. Vereinbar mit einer vermehrten Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten, zeigt sich z.B. in den meisten Fällen eine erhöhte RANK-L/OPG-Ratio [37-40]. Die bisher vorliegenden Studien zur mRNA-Expression in periprotektischen Geweben konzentrieren sich jedoch jeweils auf die Analyse weniger Faktoren und sind in ihrer Vergleichbarkeit zusätzlich durch die Verwendung unterschiedlicher Arten von Kontrollgeweben eingeschränkt [36-40].

Vor allem im Rahmen entzündlicher Geschehen scheinen Fibroblasten eine zentrale Funktion bei der Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten einzunehmen und stellen so einen potenziellen therapeutischen Angriffspunkt dar [56, 57, 61, 63, 64]. Fibroblasten können sowohl osteoprotektive (z.B. OPG) als auch die Osteoklastogenese fördernde Faktoren (z.B. M-CSF, RANK-L) exprimieren [58-62].

Ein verlässliches *in-vitro*-Modell zur isolierten Betrachtung des Einflusses von Fibroblasten auf die Osteoklastogenese gibt es jedoch nicht. Die bisher herangezogenen Kokulturen von Fibroblasten und PBMCs auf herkömmlichen Adhäsionsplatten erbrachten inhomogene, und mit den Befunden in periprotektischen Geweben teilweise nicht vereinbare Ergebnisse [58, 60, 65-69]. Eine Kokultivierung von PBMCs und Fibroblasten auf Membranen von Transwell-Platten, die Vorteile hinsichtlich einer besseren Mediumversorgung und einer reduzierten Kontaktfläche zu Fremdmaterial mit sich bringt [73, 74], wurde bisher nicht untersucht.

2.2 Zielsetzung

Ziel des Projekts war eine umfassende Charakterisierung periprotetischer Gewebe aseptisch gelockerter Endoprothesen, mit besonderem Fokus auf die mRNA-Expression direkt für den Knochenumbau relevanter Gene. Indem sowohl osteoklasten- als auch osteoblasten-assoziierte Faktoren unter Verwendung desselben Kontrollgewebes analysiert wurden, sollte eine Grundlage für Rückschlüsse auf die im periprotetischen Gewebe ablaufenden Knochenumbau-Vorgänge geschaffen werden.

Im zweiten Teil sollte der Einfluss von Fibroblasten auf die Osteoklastogenese in Kokulturen mit PBMCs isoliert untersucht werden. Der Schwerpunkt lag hierbei auf dem Vergleich eines herkömmlichen Kokultur-Modells auf Adhäsionsplatten mit einem neuen Ansatz einer Kokultivierung auf Transwell-Membranen.

2.3 Methoden

Aus periprotetischen Geweben aseptisch gelockerter Hüft- und Knieendoprothesen von 24 Patienten (15 HEP, 9 KEP) wurden Paraffinschnitte für Färbungen angefertigt, mRNA isoliert und Fibroblasten zur Kultivierung gewonnen. Die mRNA-Expressionen wesentlicher Mediatoren der Osteoklastogenese (M-CSF, RANK, RANK-L, OPG, $\text{TNF}\alpha$), jeweils zweier Osteoklasten- (TRAP, Cathepsin K) und Osteoblastenmarker (ALP, Kollagen Typ 1) sowie der Matrixmetalloproteinase-13 (MMP-13) wurden bestimmt. Synovia von Patienten, die sich aufgrund einer Arthrose einer Hüft- oder Knieendoprothesenimplantation unterzogen hatten, wurde als Kontrolle herangezogen. Patienten mit Hinweisen auf eine rheumatoide Arthritis, eine septische Arthritis oder sonstige entzündliche Grunderkrankungen wurden ausgeschlossen.

Aus periprotetischen Geweben isolierte Fibroblasten von 5 Patienten wurden zusammen mit PBMCs (2 Spender) sowohl in herkömmlichen 24-well Adhäsionsplatten als auch auf den Membranen von 24-well Transwellplatten kultiviert. Die Kulturen wurden hinsichtlich der mRNA-Expressionen von M-CSF, RANK-L, OPG und $\text{TNF}\alpha$ (Tag 0, 13 und 20) miteinander verglichen. Zusätzlich wurde nach vier Wochen das Vorhandensein TRAP-positiver, multinukleärer Zellen (TRAP- und Hoechst-Färbung) bzw. von Osteolyse-Spuren auf Dentinplättchen (Toluidinblau-Färbung) überprüft. Als Positivkontrollen einer vollständigen Osteoklastogenese wurden mit M-CSF und RANK-L stimulierte PBMC-Monokulturen, als Negativkontrollen unstimulierte PBMC-Monokulturen verwendet.

2.4 Ergebnisse

In periprothetischen Geweben aseptisch gelockerter Hüft- und Kniegelenksendoprothesen zeigten sich signifikant erhöhte mRNA-Expressionen für RANK, RANK-L, TRAP, Kollagen Typ 1, ALP und MMP-13. Die Expression von OPG war hingegen im Vergleich zu Kontrollgeweben signifikant erniedrigt; hieraus resultierten signifikant höhere RANK-L/OPG-Ratios in periprothetischen Geweben aseptisch gelockerter Implantate. M-CSF und $\text{TNF}\alpha$ wurden im Vergleich zu den Negativkontrollen tendenziell, jedoch nicht signifikant, vermehrt exprimiert. Hinsichtlich der Expression von Cathepsin K ergab sich keine Veränderung [75].

In Kokulturen von periprothetischen Fibroblasten und PBMCs auf herkömmlichen Adhäsionsplatten zeigte sich hingegen ein osteoprotektives Milieu mit insbesondere hohen OPG-Expressionen und entsprechend niedrigen RANK-L/OPG-Ratios. Die Ausbildung reifer, resorbierender Osteoklasten wurde in diesen Kokulturen sogar dann inhibiert, wenn von extern RANK-L und M-CSF zugegeben wurden [72].

Eine Kokultivierung der gleichen Zellen auf Transwell-Membranen führte zu einer deutlichen Veränderung des Expressionsprofils mit einer signifikant erhöhten $\text{TNF}\alpha$ -Expression und einer mehr als hundertfach verminderten OPG-Expression. Aufgrund einer stabilen RANK-L-Expression zeigten sich im Vergleich zu herkömmlichen Kokulturen signifikant höhere RANK-L/OPG-Ratios. Hinsichtlich der M-CSF-Expression ergab sich kein Unterschied. Osteolyse-Spuren auf Dentinplättchen konnten nur in den Positivkontrollen nachgewiesen werden [72].

2.5 Diskussion und Schlussfolgerung

Die Studie „Factors Regulating Bone Remodeling Processes in Aseptic Implant Loosening“ stellt eine umfassende Analyse unterschiedlicher molekularpathologisch relevanter Faktoren der aseptischen Endoprothesenlockerung dar. In periprothetischen Geweben konnten, vereinbar mit dem Auftreten von Osteolysen, signifikant erhöhte Expressionen von osteoklasten- und osteoklastogenese-assoziierten Genen (RANK-L, RANK, TRAP) sowie von MMP-13 nachgewiesen werden. Die erhöhten RANK-L/OPG-Ratios stimmen mit Ergebnissen anderer Autoren überein [37-40] und sprechen für eine zentrale Rolle der RANK-L/RANK/OPG-Achse bei der Ausbildung periprothetischer Osteolysen im Rahmen der aseptischen Lockerung. Die gleichzeitig erhöhte Expression der Osteoblasten-Marker (ALP, Kollagen Typ 1) stellt einen interessanten, bisher nicht beschriebenen Befund [44-46] dar und sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht

werden. Die vorliegende Arbeit bietet, sowohl aufgrund der vergleichsweise hohen Patientenzahl, der Anzahl analysierter Faktoren, als auch durch strikte Auswahlkriterien für Negativkontrollen, eine Basis für weitere Studien zur Untersuchung der molekularpathologischen Vorgänge im Rahmen der aseptischen Endoprothesenlockerung.

Im Rahmen der zweiten Publikation "Impact of Periprosthetic Fibroblast-Like Cells on Osteoclastogenesis in Co-Culture with Peripheral Blood Mononuclear Cells Varies Depending on Culture System" wird mit Kokulturen von periprosthetischen Fibroblasten und PBMCs auf Transwell-Membranen ein Ansatz für ein optimiertes *in-vitro*-Modell zur isolierten Untersuchung des Einflusses periprosthetischer Fibroblasten auf die Osteoklastogenese vorgestellt.

Ein wesentliches Ergebnis dieser Studie ist, dass periprosthetische Fibroblasten derselben Patienten, je nach Kultursystem, sowohl ein vorwiegend osteoprotektives (auf herkömmlichen Kulturplatten) als auch ein osteolyse-begünstigendes Expressionsprofil (auf Transwell-Membranen) aufweisen konnten. Neben einer signifikant erhöhten $\text{TNF}\alpha$ -Expression unterschied sich insbesondere die RANK-L/OPG-Ratio, die als wesentliche Triebkraft der Entstehung periprosthetischer Osteolysen einzuordnen ist [26, 27], im Vergleich der beiden Kultursysteme. Die Tatsache, dass diese Änderung der Genexpression allein durch eine relativ geringe Variation der Kulturbedingungen hervorgerufen werden konnte, bekräftigt die Rolle der Fibroblasten als einen vielversprechenden Angriffspunkt für zukünftige pharmakologische Strategien zur Prophylaxe und Therapie der aseptischen Endoprothesenlockerung.

Die hohen RANK-L/OPG-Ratios in den Transwell-Kokulturen spiegelten die Befunde von Analysen periprosthetischer Gewebe [36-40] besser wider als die entsprechenden Expressionsniveaus in herkömmlichen Kokulturen [65, 66]. Gerade in Anbetracht der nachgewiesenen mRNA-Expressions-Variabilität kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass sich die Gegebenheiten *in vivo* mithilfe derart vereinfachter Kokultur-Modelle hinreichend nachzeichnen lassen. Einfache *in-vitro*-Modelle können aber herangezogen werden, um Hypothesen zu generieren, die dann in komplexeren Experimenten weiter untersucht werden können. Die hier vorgestellte Kokultivierung von periprosthetischen Fibroblasten und PBMCs auf Transwell-Membranen stellt somit einen interessanten Ansatz für zukünftige Studien zur isolierten Untersuchung der Funktion von Fibroblasten bei der periprosthetischen Osteoklastogenese dar.

3 Summary

[72, 75]

3.1 Background

Aseptic loosening due to periprosthetic osteolysis is a serious late complication of endoprosthetic hip or knee joint replacement [4-11]. It is the result of periprosthetic inflammation, which leads to an increase in osteoclast differentiation and activity [12-14]. The expression levels of osteoclast markers and mediators of osteoclastogenesis in periprosthetic tissues of aseptically loosened implants were shown to be altered, compared to controls [36-40]. For example, the RANK-L/OPG ratio was found to be elevated [37-40], consistent with an increased osteoclast activity. Previous studies on mRNA expression in periprosthetic tissues focused on only a few factors and have a limited comparability due to different types of control tissues [36-40].

Particularly in inflammatory diseases involving osteolysis, fibroblasts appear to play a central role in the differentiation and activation of osteoclasts and thus represent a potential therapeutic target [56, 57, 61, 63, 64]. Fibroblasts can express both osteoprotective (e.g. OPG) and osteoclastogenic mediators (e.g. M-CSF, RANK-L) [58-62].

However, there is a lack of reliable *in vitro* models to separately analyze the influence of fibroblasts on osteoclastogenesis. Previous studies, which have been using co-cultures of fibroblasts and PBMCs on conventional adherent cell culture plates, report heterogeneous results, partly contradicting the findings in original periprosthetic tissue [58, 60, 65-69]. A co-cultivation of PBMCs and fibroblasts on membranes of transwell plates, which are known to provide a better medium supply and a reduced area of contact to foreign material [73, 74], has not yet been investigated.

3.2 Objective

The aim of this project was to conduct a comprehensive analysis of periprosthetic tissue of aseptically loosened endoprostheses with a particular focus on the mRNA expression of genes directly relevant to bone remodeling. In order to obtain further understanding about bone remodeling processes taking place in periprosthetic tissues, a large number of factors related to both osteoclast and osteoblast activity were analyzed using the same control tissue.

The second objective was to separately investigate the role of periprosthetic fibroblasts in osteoclastogenesis. Here, we focused on the comparison of two different *in vitro* co-culture systems, conventional adherent cell-culture plates versus a new cell culture model on transwell membranes.

3.3 Methods

We prepared paraffin sections from periprosthetic tissues of aseptically loosened hip and knee endoprostheses of 24 patients (15 hip, 9 knee) for staining, extracted mRNA and isolated fibroblasts for cell culture. The mRNA expression of the main mediators of osteoclastogenesis (M-CSF, RANK, RANK-L, OPG, TNF α), as well as of osteoclast- (TRAP, cathepsin K) and osteoblast- (ALP, collagen type 1) markers and matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) were determined. Synovial tissues from patients undergoing implantation of hip or knee endoprostheses due to osteoarthritis were used as a control. Patients with signs of rheumatoid arthritis, septic arthritis or other inflammatory diseases were excluded.

Fibroblasts isolated from periprosthetic tissues of 5 patients were co-cultivated with PBMCs (2 donors) in conventional 24-well plates as well as on the membranes of 24-well transwell plates. These cell culture-systems were compared in terms of the mRNA expression of M-CSF, RANK-L, OPG and TNF α (on days 0, 13 and 20). Additionally, we checked for the presence of TRAP-positive, multinuclear cells (TRAP and Hoechst staining) and traces of osteolysis on dentine slices (toluidine blue staining) after four weeks. PBMC monocultures stimulated with M-CSF and RANK-L were used as a positive control for complete osteoclastogenesis; unstimulated PBMC monocultures served as a negative control.

3.4 Results

Periprosthetic tissues of aseptically loosened hip and knee endoprostheses showed a significant increase in mRNA expressions of RANK, RANK-L, TRAP, collagen type 1, ALP and MMP-13. OPG expression was significantly decreased compared to control tissues, which resulted in significantly higher RANK-L/OPG ratios in periprosthetic tissues of aseptically loosened implants. M-CSF and TNF α expression tended to be higher compared to controls (not significant). There was no change in the expression levels of cathepsin K [75].

However, in co-cultures of periprosthetic fibroblasts and PBMCs on conventional plates we found a rather osteoprotective expression profile with high OPG expression and low RANK-L/OPG ratios. The formation of mature, resorbing osteoclasts was inhibited and could not even be activated by an additional stimulation with RANK-L and M-CSF [72].

Co-cultivation on transwell membranes resulted in a significant change of mRNA expression profiles with an increased TNF α level and a more than hundredfold decrease of OPG expression. As the expression of RANK-L was unaltered, we observed significantly higher RANK-L/OPG ratios compared to conventional co-cultures. The expression of M-CSF remained unchanged. Resorption on dentin slices could only be detected in positive controls [72].

3.5 Discussion and conclusion

The study "Factors Regulating Bone Remodeling Processes in Aseptic Implant Loosening" is a large-scale analysis of factors with molecular pathological relevance in aseptic loosening of hip and knee endoprostheses. In accordance with an augmented osteolytic activity in periprosthetic tissues of aseptically loosened implants, we showed significantly increased mRNA expressions of genes associated with osteoclastogenesis or mature osteoclasts (RANK-L, RANK, TRAP) as well as of MMP-13. Consistent with results of previous studies [37-40], RANK-L/OPG ratios were found to be elevated, suggesting a central role of the RANK-L/RANK/OPG axis in the formation of periprosthetic osteolysis in aseptic implant loosening. We found a simultaneous increase in the expression of osteoblast markers (ALP, collagen type 1), which is an interesting, previously undescribed [44-46] finding, suggesting further investigation in future studies. Due to a relatively high number of patients included, the quantity of factors analyzed and the strict criteria for negative controls, this study provides a foundation for further research of molecular processes involved in aseptic loosening of endoprostheses.

In our second publication "Impact of Periprosthetic Fibroblast-Like Cells on Osteoclastogenesis in Co-Culture with Peripheral Blood Mononuclear Cells Varies Depending on Culture System", we presented a novel approach for an optimized *in vitro* model to separately examine the influence of periprosthetic fibroblasts on osteoclastogenesis by co-cultivation with PBMCs on transwell membranes.

One major finding of this study was that periprosthetic fibroblasts derived from the same patient had either a predominantly osteoprotective expression profile (on conventional plates) or one that rather promoted osteoclastogenesis (on transwell membranes),

depending on the cell-culture system. In addition to an increase in TNF α expression, the RANK-L/OPG ratio, which plays an important role in periprosthetic osteolysis [26, 27], differed significantly between the two co-culture systems. The fact that this change in gene expression could be induced by a relatively small variation in culture conditions, suggests fibroblasts as a promising target for future pharmacological strategies for the prevention and therapy of aseptic loosening of endoprostheses.

The high RANK-L/OPG ratios in transwell co-cultures were more in line with findings in original periprosthetic tissues [36-40] than the expression profiles in conventional co-culture systems [65, 66]. Taking into account the variability of mRNA expression of fibroblasts we observed in this study, we cannot assume that the *in vivo* conditions can be adequately mimicked using such a minimalist co-culture model. However, simple *in vitro* models can be used to generate hypotheses which can further be investigated in more complicated experimental settings. Hence, the co-cultivation of PPFs and PBMCs on transwell membranes is an engaging approach for future studies examining the role of fibroblasts in periprosthetic osteoclastogenesis.

4 Veröffentlichungen

4.1 Veröffentlichung I: Factors Regulating Bone Remodeling Processes in Aseptic Implant Loosening

Hartmann ES, Köhler MI, Huber F, Redeker JI, Schmitt B, Schmitt-Sody M, Summer B, Fottner A, Jansson V, Mayer-Wagner S. *Factors Regulating Bone Remodeling Processes in Aseptic Implant Loosening*. J Orthop Res. 2017 Feb;35(2):248-257.

Zur Publikation angenommen am 19.04.2016; online publiziert am 08.05.2016

<https://doi.org/10.1002/jor.23274>

4.2 Veröffentlichung II: Impact of Periprosthetic Fibroblast-Like Cells on Osteoclastogenesis in Co-Culture with Peripheral Blood Mononuclear Cells Varies Depending on Culture System

Koehler MI, Hartmann ES, Schluessel S, Beck F, Redeker JI, Schmitt B, Unger M, van Griensven M, Summer B, Fottner A, Mayer-Wagner S. *Impact of Periprosthetic Fibroblast-Like Cells on Osteoclastogenesis in Co-Culture with Peripheral Blood Mononuclear Cells Varies Depending on Culture System*. Int J Mol Sci. 2019 May 26;20(10):2583.

Zur Publikation angenommen am 23.05.2019; online publiziert am 26.05.2019

[https://doi.org/ 10.3390/ijms20102583](https://doi.org/10.3390/ijms20102583)

5 Literaturverzeichnis

1. IQTIG – Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen, *Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2018 Knieendoprothesenversorgung; Qualitätsindikatoren und Kennzahlen; Stand 23.07.2019*. 2019.
2. IQTIG – Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen, *Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2018 Hüftendoprothesenversorgung; Qualitätsindikatoren und Kennzahlen; Stand 23.07.2019*. 2019.
3. Statistisches Bundesamt. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Die 50 häufigsten Operationen der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern; Jahr 2018, alle Geschlechter*. Available from: http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=3&p_aid=15009985&nummer=666&p_sprache=D&p_indsp=99999999&p_aid=10970109 Abgerufen am 26.07.2020
4. Bayliss, L.E., et al., *The effect of patient age at intervention on risk of implant revision after total replacement of the hip or knee: a population-based cohort study*. Lancet, 2017. **389**(10077): p. 1424-1430.
5. Evans, J.T., et al., *How long does a hip replacement last? A systematic review and meta-analysis of case series and national registry reports with more than 15 years of follow-up*. Lancet, 2019. **393**(10172): p. 647-654.
6. NJR Editorial Board, *16th Annual Report 2019; National Joint Registry for England, Wales, Northern Ireland and the Isle of Man*. 2019.
7. Vanhegan, I.S., et al., *A financial analysis of revision hip arthroplasty: the economic burden in relation to the national tariff*. J Bone Joint Surg Br, 2012. **94**(5): p. 619-23.
8. Bozic, K.J., et al., *Hospital resource utilization for primary and revision total hip arthroplasty*. J Bone Joint Surg Am, 2005. **87**(3): p. 570-6.
9. Saleh, K.J., et al., *Functional outcome after revision hip arthroplasty: a metaanalysis*. Clin Orthop Relat Res, 2003(416): p. 254-64.
10. Lenguerrand, E., et al., *Pain and Function Recovery Trajectories following Revision Hip Arthroplasty: Short-Term Changes and Comparison with Primary Hip Arthroplasty in the ADAPT Cohort Study*. PLoS One, 2016. **11**(10): p. e0164839.
11. Grimberg, A., et al., *Endoprothesenregister Deutschland (EPRD); Jahresbericht 2019*. 2019.
12. Cobelli, N., et al., *Mediators of the inflammatory response to joint replacement devices*. Nat Rev Rheumatol, 2011. **7**(10): p. 600-8.

13. Gallo, J., et al., *Osteolysis around total knee arthroplasty: a review of pathogenetic mechanisms*. Acta Biomater, 2013. **9**(9): p. 8046-58.
14. Gallo, J., et al., *Contributions of human tissue analysis to understanding the mechanisms of loosening and osteolysis in total hip replacement*. Acta Biomater, 2014. **10**(6): p. 2354-66.
15. Boyle, W.J., Simonet, W.S., and Lacey, D.L., *Osteoclast differentiation and activation*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 337-42.
16. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*, 6. Auflage. Stuttgart 2019: Thieme.
17. Teitelbaum, S.L. and Ross, F.P., *Genetic regulation of osteoclast development and function*. Nat Rev Genet, 2003. **4**(8): p. 638-49.
18. Yoshida, H., et al., *The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene*. Nature, 1990. **345**(6274): p. 442-4.
19. Lacey, D.L., et al., *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. Cell, 1998. **93**(2): p. 165-76.
20. Simonet, W.S., et al., *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. Cell, 1997. **89**(2): p. 309-19.
21. Quinn, J.M., et al., *A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro*. Endocrinology, 1998. **139**(10): p. 4424-7.
22. Boyce, B.F., *Advances in osteoclast biology reveal potential new drug targets and new roles for osteoclasts*. J Bone Miner Res, 2013. **28**(4): p. 711-22.
23. Glantschnig, H., et al., *M-CSF, TNFalpha and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase*. Cell Death Differ, 2003. **10**(10): p. 1165-77.
24. Hodge, J.M., et al., *M-CSF potently augments RANKL-induced resorption activation in mature human osteoclasts*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e21462.
25. Hsu, H., et al., *Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3540-5.
26. Grimaud, E., et al., *Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis*. Am J Pathol, 2003. **163**(5): p. 2021-31.
27. Hofbauer, L.C. and Schoppet, M., *Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases*. JAMA, 2004. **292**(4): p. 490-5.

28. Schett, G. and Gravallesse, E., *Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment*. Nat Rev Rheumatol, 2012. **8**(11): p. 656-64.
29. Fuller, K., Kirstein, B., and Chambers, T.J., *Murine osteoclast formation and function: differential regulation by humoral agents*. Endocrinology, 2006. **147**(4): p. 1979-85.
30. Kobayashi, K., et al., *Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction*. J Exp Med, 2000. **191**(2): p. 275-86.
31. O'Brien, W., et al., *RANK-Independent Osteoclast Formation and Bone Erosion in Inflammatory Arthritis*. Arthritis Rheumatol, 2016. **68**(12): p. 2889-2900.
32. Yokota, K., et al., *Combination of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 induces mouse osteoclast-like cells with bone resorption activity both in vitro and in vivo*. Arthritis Rheumatol, 2014. **66**(1): p. 121-9.
33. Azuma, Y., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts*. J Biol Chem, 2000. **275**(7): p. 4858-64.
34. Sabokbar, A., Kudo, O., and Athanasou, N.A., *Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periprosthetic osteolysis*. J Orthop Res, 2003. **21**(1): p. 73-80.
35. Lam, J., et al., *TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand*. J Clin Invest, 2000. **106**(12): p. 1481-8.
36. Jansen, E., et al., *Characterization of macrophage polarizing cytokines in the aseptic loosening of total hip replacements*. J Orthop Res, 2014. **32**(9): p. 1241-6.
37. Mandelin, J., et al., *Imbalance of RANKL/RANK/OPG system in interface tissue in loosening of total hip replacement*. J Bone Joint Surg Br, 2003. **85**(8): p. 1196-201.
38. Koulouvaris, P., et al., *Expression profiling reveals alternative macrophage activation and impaired osteogenesis in periprosthetic osteolysis*. J Orthop Res, 2008. **26**(1): p. 106-16.
39. Crotti, T.N., et al., *Factors regulating osteoclast formation in human tissues adjacent to peri-implant bone loss: expression of receptor activator NFkappaB, RANK ligand and osteoprotegerin*. Biomaterials, 2004. **25**(4): p. 565-73.
40. Tomankova, T., et al., *Comparison of periprosthetic tissues in knee and hip joints: differential expression of CCL3 and DC-STAMP in total knee and hip arthroplasty and similar cytokine profiles in primary knee and hip osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2014. **22**(11): p. 1851-60.

41. Goodman, S.B., et al., *Cellular profile and cytokine production at prosthetic interfaces. Study of tissues retrieved from revised hip and knee replacements.* J Bone Joint Surg Br, 1998. **80**(3): p. 531-9.
42. Takei, I., et al., *Messenger ribonucleic acid expression of 16 matrix metalloproteinases in bone-implant interface tissues of loose artificial hip joints.* J Biomed Mater Res, 2000. **52**(4): p. 613-20.
43. Syggelos, S.A., et al., *Extracellular matrix degradation and tissue remodeling in periprosthetic loosening and osteolysis: focus on matrix metalloproteinases, their endogenous tissue inhibitors, and the proteasome.* Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 230805.
44. O'Neill, S.C., et al., *The role of osteoblasts in peri-prosthetic osteolysis.* Bone Joint J, 2013. **95-B**(8): p. 1022-6.
45. Atkins, G.J., et al., *The induction of a catabolic phenotype in human primary osteoblasts and osteocytes by polyethylene particles.* Biomaterials, 2009. **30**(22): p. 3672-81.
46. Queally, J.M., et al., *Cobalt ions induce chemokine secretion in primary human osteoblasts.* J Orthop Res, 2009. **27**(7): p. 855-64.
47. Graefe, K.H., Lutz, W., and Bönisch, H., *Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie, 2. Auflage.* Stuttgart 2016: Thieme.
48. Tsutsumi, R., et al., *Differential effects of biologic versus bisphosphonate inhibition of wear debris-induced osteolysis assessed by longitudinal micro-CT.* J Orthop Res, 2008. **26**(10): p. 1340-6.
49. Hansson, U., et al., *Once-weekly oral medication with alendronate does not prevent migration of knee prostheses: A double-blind randomized RSA study.* Acta Orthop, 2009. **80**(1): p. 41-5.
50. Skoldenberg, O.G., et al., *The effect of weekly risedronate on periprosthetic bone resorption following total hip arthroplasty: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.* J Bone Joint Surg Am, 2011. **93**(20): p. 1857-64.
51. Muren, O., et al., *No effect of risedronate on femoral periprosthetic bone loss following total hip arthroplasty. A 4-year follow-up of 61 patients in a double-blind, randomized placebo-controlled trial.* Acta Orthop, 2015. **86**(5): p. 569-74.
52. Ralston, S.H., et al., *Clinical, biochemical, and radiographic effects of aminohydroxypropylidene bisphosphonate treatment in rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis, 1989. **48**(5): p. 396-9.
53. Valleala, H., et al., *Two year randomized controlled trial of etidronate in rheumatoid arthritis: changes in serum aminoterminal telopeptides correlate with radiographic progression of disease.* J Rheumatol, 2003. **30**(3): p. 468-73.

-
54. Jarrett, S.J., et al., *Preliminary evidence for a structural benefit of the new bisphosphonate zoledronic acid in early rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(5): p. 1410-4.
55. Zhang, Q., et al., *Tumor necrosis factor prevents alendronate-induced osteoclast apoptosis in vivo by stimulating Bcl-xL expression through Ets-2*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(9): p. 2708-18.
56. Souza, P.P. and Lerner, U.H., *The role of cytokines in inflammatory bone loss*. Immunol Invest, 2013. **42**(7): p. 555-622.
57. Tsukasaki, M. and Takayanagi, H., *Osteoimmunology: evolving concepts in bone-immune interactions in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2019. **19**(10): p. 626-642.
58. Sabokbar, A., et al., *Arthroplasty membrane-derived fibroblasts directly induce osteoclast formation and osteolysis in aseptic loosening*. J Orthop Res, 2005. **23**(3): p. 511-9.
59. Koreny, T., et al., *The role of fibroblasts and fibroblast-derived factors in periprosthetic osteolysis*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(10): p. 3221-32.
60. Quinn, J.M., et al., *Fibroblastic stromal cells express receptor activator of NF-kappa B ligand and support osteoclast differentiation*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(8): p. 1459-66.
61. Gravallesse, E.M., et al., *Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(2): p. 250-8.
62. Qian, Y., et al., *Substance P stimulates production of interleukin 1beta and tumor necrosis factor alpha in fibroblasts from hip periprosthetic membrane*. J Arthroplasty, 2008. **23**(4): p. 581-5.
63. Bartok, B. and Firestein, G.S., *Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis*. Immunol Rev, 2010. **233**(1): p. 233-55.
64. Danks, L., et al., *RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation*. Ann Rheum Dis, 2016. **75**(6): p. 1187-95.
65. de Vries, T.J., et al., *Gingival fibroblasts are better at inhibiting osteoclast formation than periodontal ligament fibroblasts*. J Cell Biochem, 2006. **98**(2): p. 370-82.
66. Bloemen, V., et al., *Direct cell-cell contact between periodontal ligament fibroblasts and osteoclast precursors synergistically increases the expression of genes related to osteoclastogenesis*. J Cell Physiol, 2010. **222**(3): p. 565-73.
67. Dickerson, T.J., et al., *Rheumatoid and pyrophosphate arthritis synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis independently of RANKL, TNF and IL-6*. J Autoimmun, 2012. **39**(4): p. 369-76.

68. Takayanagi, H., et al., *Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(2): p. 259-69.
69. Costa-Rodrigues, J. and Fernandes, M.H., *Paracrine-mediated differentiation and activation of human haematopoietic osteoclast precursor cells by skin and gingival fibroblasts*. Cell Prolif, 2011. **44**(3): p. 264-73.
70. Kanzaki, H., et al., *Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(2): p. 210-20.
71. Kook, S.H., et al., *Mechanical force augments the anti-osteoclastogenic potential of human gingival fibroblasts in vitro*. J Periodontal Res, 2009. **44**(3): p. 402-10.
72. Koehler, M.I., et al., *Impact of Periprosthetic Fibroblast-Like Cells on Osteoclastogenesis in Co-Culture with Peripheral Blood Mononuclear Cells Varies Depending on Culture System*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(10).
73. Murdoch, A.D., et al., *Chondrogenic differentiation of human bone marrow stem cells in transwell cultures: generation of scaffold-free cartilage*. Stem Cells, 2007. **25**(11): p. 2786-96.
74. Sabater, D., et al., *The use of Transwells improves the rates of differentiation and growth of cultured 3T3L1 cells*. Anal Bioanal Chem, 2013. **405**(16): p. 5605-10.
75. Hartmann, E.S., et al., *Factors regulating bone remodeling processes in aseptic implant loosening*. J Orthop Res, 2017. **35**(2): p. 248-257.

6 Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkalische Phosphatase
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
ERPD	Endoprothesenregister Deutschland
HEP	Hüftgelenksendoprothese
IL	Interleukin
KEP	Kniegelenksendoprothese
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NJR	<i>National Joint Registry</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
OPG	Osteoprotegerin
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RANK	<i>receptor activator of NF-κB</i>
RANK-L	<i>receptor activator of NF-κB ligand</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAP	<i>tartrate-resistant acid phosphatase</i>

7 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Professor Susanne Mayer, für die Vergabe des spannenden Themas und die exzellente Betreuung. In all den Jahren hatte ich in ihr immer eine engagierte Ansprechpartnerin, die mir während der Bearbeitung des Projekts mit ihrer großen wissenschaftlichen Erfahrung und mit motivierenden Worten zur Seite stand. Es gab immer Zeit für rege wissenschaftliche Diskussionen und die Gelegenheit, eigene Ideen in die Projektplanung einzubringen. Besonders dankbar bin ich für die konstruktive Unterstützung bei der Etablierung neuer und zusätzlicher Methoden, sowie für die hervorragende Anleitung bei der Veröffentlichung der Forschungsarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Bärbel Schmitt, Dr. Julia Redeker, Dr. Eliza Hartmann, Dr. Felicitas Beck und Sabine Schlüssel für die stets unkomplizierte Hilfe bei praktischen und theoretischen Problemen sowie die angenehme, kurzweilige und lehrreiche Zusammenarbeit im Labor vielmals bedanken.

Ein großer Dank gilt auch Frau Marina Unger, Herrn Dipl.-Ing. Peter Föhr, Herrn Dr. Burkhard Summer und Herrn Dr. Alexander Crispin für die methodische Unterstützung.

Besonders bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn Professor Tienush Rassaf und Herrn Professor Reza Wakili an meiner jetzigen Arbeitsstelle in der Klinik für Kardiologie und Angiologie des Universitätsklinikums Essen für die Unterstützung und die Schaffung der nötigen Freiräume, um meine Dissertation neben der Arbeit in der Klinik abzuschließen.

Nicht zuletzt gilt mein herzlicher Dank meiner Familie. Ohne ihre bedingungslose Unterstützung und die vielen aufmunternden Worte wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen.

Drittmittel

Die vorliegende Forschungsarbeit wurde drittmittelfinanziert im Rahmen des DFG-Forschungsprojekts „Analyse periprothetischer Fibroblasten und deren Funktion im Bereich orthopädischer und dentaler Implantatlockerungen“ (Deutsche Forschungsgemeinschaft, Prof. Dr. med. Susanne Mayer, Projektnummer 192241435)

8 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Miriam Köhler, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Analyse von Periimplantatgeweben und des Einflusses periprothetischer Fibroblasten auf die Osteoklastogenese bei der aseptischen Endoprothesenlockerung“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Essen, den 02.07.2021

Miriam Köhler